

Syndecan-4 in cell signaling and membrane trafficking

Citation for published version (APA):

Tkachenko, E. (2005). Syndecan-4 in cell signaling and membrane trafficking. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2005

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 7

Summary

To date, syndecan-4 is the best described member of the syndecan family. Cell signaling events regulated by ligand binding to the extracellular part of this protein trigger actin cytoskeleton rearrangement resulting in the modulation of cell functions, such as cell migration and proliferation. Furthermore, syndecan-4 trafficking has been implicated in the uptake of natural ligands, that include growth factors, cell matrix proteins, LDL, and infectious agents including retroviruses.

Chapter 1 contains a review of signaling events regulated by syndecan. It also describes phenotypes of animal models lacking one of the syndecan family proteins. It appears that one syndecan subfamily (syndecan-1,-3) plays a mainly negative role in promotion of growth factor response, whereas another (syndecan-2,-4) enhances those responses. The main difference between syndecan-2 and -4 functions is in the time and location of their expression. Generally, syndecan-2 plays a major role in development, while syndecan-4 in acute response to tissue injury. For this reason, we studied syndecan-4's role in tissue injury-induced angiogenesis.

In Chapter 2, we investigated the effect of increased heparan sulfate mass due to overexpression of syndecan-4 in cardiomyocytes, on heart microvascular function. We found that the expressing animals demonstrated a significant increase in nitric oxide release in the coronary effluent in response to FGF-2. *In vitro*, coronary microvessels derived from those transgenic mice demonstrated increased relaxation response to FGF2 compared to control mice. Addition of exogenous heparan sulfate enhanced FGF-2 induced vasodilation in microvessels from control mice. Thus, we demonstrated that alteration of heparan sulfate production has a profound effect on microvascular homeostasis.

Further chapters are almost exclusively dedicated to the role of syndecan-4 cytoplasmic tail in the cell signaling.

In Chapter 3, the role of different cytoplasmic domains in FGF-2 signal modulation was investigated. Mutations in the cytoplasmic tail that either reduced its affinity to PIP_2 , or disrupted its PDZ-binding motif, produced an FGF2-specific dominant-negative phenotype in endothelial cells that demonstrated a marked decline in their migration and proliferation rates. Those cells also exhibited impaired capacity to form tubes on Matrigel. This molecular mechanism was determined to consist of a decrease in the syndecan-4-dependent activation of $\text{PKC}\alpha$.

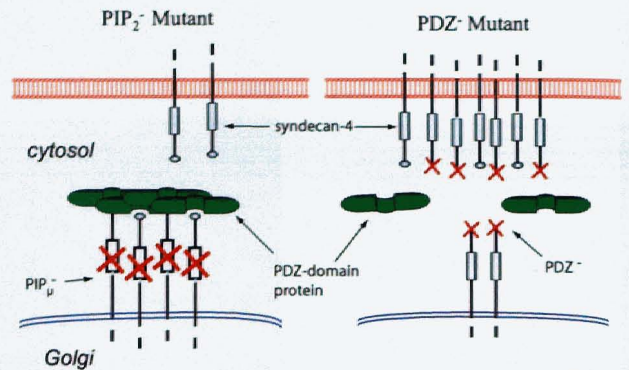


Figure 1. Dominant-negative effect of syndecan-4 mutants. Overexpression of the mutant with disrupted PIP_2 binding site (left) results in its accumulation in the Golgi region and leads to the sequestering of PDZ-interacting protein(s) from the plasma membrane. In contrast, syndecan-4 with a mutated PDZ-binding motif (right) forms oligomers with endogenous protein thus preventing its binding to PDZ-domain containing protein(s).

Thus, PDZ-binding partner(s) of syndecan-4 play a critical role in the modulation of FGF2 signaling. Interestingly, a syndecan-4 mutant lacking the PIP_2 binding motif failed to be expressed on the cell surface. The mutant accumulates in the Golgi region, instead. Therefore, we hypothesized that depletion of the PDZ-binding partner by competitive binding due to the overexpression of the Golgi-retained syndecan mutant resulted in dominant negative cell phenotype (Figure 1). Indeed, in contrast to single mutations, mutations of the syndecan-4 cytoplasmic tail that resulted in the reduced affinity of the mutant to both PDZ domain and PIP_2 , generated a phenotype that respond normally to FGF-2 stimulation. The role of the PDZ-binding motif as well as an identification of the critical interacting protein is further discussed in Chapter 6.

In Chapter 4, we studied the membrane distribution of the core protein using an Fc receptor (FcR)-syndecan-4 chimera prior to and following FGF2- or antibodies-induced clustering. Previously described cholesterol rich compartments called lipid rafts were shown to contain a variety of signaling proteins that include syndecan-4 binding partners Src and $\text{PKC}\alpha$. We found that while unclustered syndecan-4 was present predominantly in the non-raft membrane compartment, clustering induced extensive redistribution to the non-caveolae lipid rafts. Clustering of syndecan-4 also induces its endocytosis. Interestingly, syndecan-4 positive endocytic vesicles can travel in tandem with caveolae vesicles. The role of this interaction remains unknown. FGF2 induced syndecan-4 uptake may play an important role in modulation of growth factor signaling.

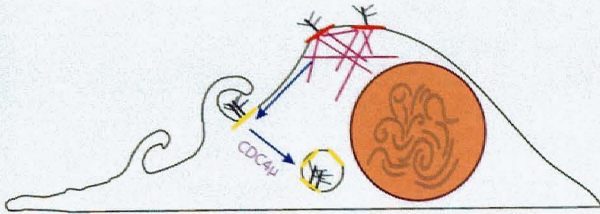


Figure 2. Mechanism of syndecan-4 induced endocytosis.

FGF2 binding to syndecan-4 results in a shift of the FGF2/syndecan-4 complex to lipid rafts and this complex is then internalized via the constitutive CDC-42 dependent macropinocytic pathway.

In Chapter 5, the initial steps of syndecan-4 endocytosis and its role in FGF2 internalization were characterized. We found that syndecan-4 uptake, induced either by treatment with FGF2 or by antibody clustering, requires the integrity of plasma membrane lipid rafts for its initiation and occurs in a non-clathrin, non-dynamin dependent manner. Our results demonstrate that FGF2 endocytosis needs syndecan-4 clustering-dependent activation of Rac1 and the intact CDC42-dependent macropinocytic pathway. Therefore, we have two steps in syndecan-4 uptake. First, syndecan is shifted to the lipid rafts followed by clustering. As a result of this shift, syndecan assembles a signaling complex that activates Rac1. Second, syndecan-4 containing lipid rafts undergo endocytosis using constitutive, CDC42 driven macropinocytosis (Figure 2).

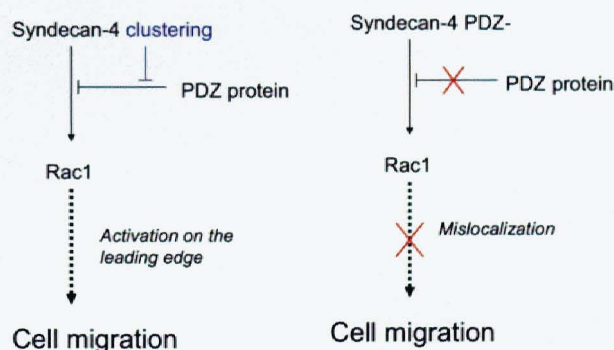


Figure 3. Mechanism of syndecan-4 induced cell migration.

The syndecan-induced signaling complex is capable of activating Rac1. Interaction of syndecan-4 with PDZ-domain-containing protein inhibits this activation. Syndecan clustering results in activation of Rac1 by selective removal of this inhibition which leads to the increase of cell migration (*left*). PDZ-binding domain mutation leads to inability of the PDZ-domain containing protein to inhibit Rac1 activation and results in the high basal level of Rac-1 activity (*right*).

Activation of Rac1 is a critical step in migratory polarization of cells. In Chapter 6, we investigated the migratory response of endothelial cells to clustering of syndecan-4. We showed that syndecan-4 promotes cell migration upon ligand binding by activating Rac1 and localizing it to the leading edge of the cell. Cells expressing syndecan-4 with a mutated PDZ-binding region or cells lacking synectin, a PDZ domain containing protein that interacts with syndecan-4, fail to migrate in response to syndecan-4 clustering (Figure 3). Thus, the syndecan-4/synectin interaction is critical in clustering-induced cell migration.

In conclusion, our studies show regulation of cellular and organ functions by syndecan-4 ranging from effects due to the simple increase of its heparan sulfate mass to complex intracellular interactions. The described trafficking and signaling properties of syndecan-4 contribute to the understanding of growth factor and cell matrix induced angiogenesis.

Chapter 7

Samenvatting

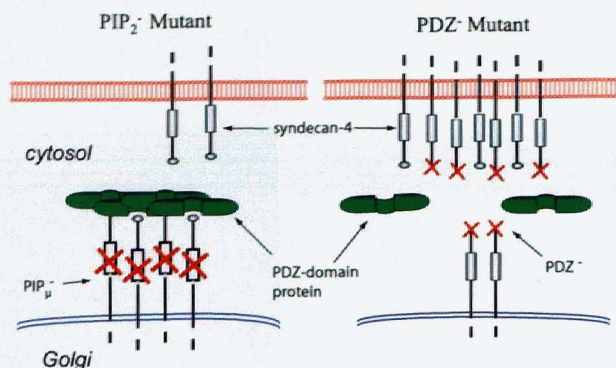
Syndecan 4 is het best beschreven lid van de syndecan-familie. De signaaltransductie van syndecan-4, die gereguleerd wordt door binding van het ligand aan het extracellulaire deel van het molecuul, induceert herschikking van het actine-cytoskelet hetgeen cellulaire functies, zoals celmigratie en -proliferatie, moduleert. Verder is syndecan-4 betrokken bij de opname van 'natuurlijke liganden' waaronder groeifactoren, cel-matrix eiwitten en LDL, alsmede infectieuze agentia zoals retrovirussen.

In hoofdstuk 1 worden signaaltransductie-pathways die door syndecan-4 wordt gereguleerd beschreven. Verder worden fenotypes van de diermodellen beschreven die deficient zijn voor een van de syndecan-familieleden. Een van de syndecan subfamilies (syndecan-1 en 3) speelt een negatieve rol in het activeren van de respons op groeifactoren, terwijl een andere subfamilie (syndecan 2 en 4) deze net stimuleert. Het voornaamste verschil tussen syndecan 2 en 4 betreft tijdsspanne en localisatie. Syndecan-2 speelt een rol in de ontwikkeling, terwijl syndecan-4 een rol speelt in de acute respons na weefselbeschadiging. Het doel van dit proefschrift was dan ook het bestuderen van de rol van syndecan-4 in de angiogenese die optreedt na weefsel schade.

In hoofdstuk 2 hebben we het effect van een toegenomen heparan-sulfaat massa op de microvasculatuur van het hart onderzocht. Dit is uitgevoerd door syndecan-4 tot overexpressie te brengen in de cardiomyocyten. Het bleek dat de dieren die syndecan-4 tot overexpressie brachten, meer NO tot expressie brachten in het coronair effluent na toediening van FGF2. In vitro toonden de coronaire microvasculatuur van deze muizen een toegenomen relaxatie na FGF2 toediening in vergelijking met controle muizen. Toediening van exogeen heparansulfaat versterkte de FGF-2 geïnduceerde vasodilatatie in microvaten van controle muizen. In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat verschillen in heparansulfaatproductie een duidelijk effect heeft op de homeostase van de microvasculatuur.

De volgende hoofdstukken hebben betrekking op de rol van de C-terminale deel van syndecan-4 in de cel signaaltransductie.

In hoofdstuk 3 hebben we de rol van verschillende cytoplasmatische domeinen van syndecan-4 onderzocht tijdens de modulatie van FGF-2 signaaltransductie. Mutaties in het PIP₂ bindingsdomein of het PDZ-bindingsdomein resulteerde in een FGF2-specifiek



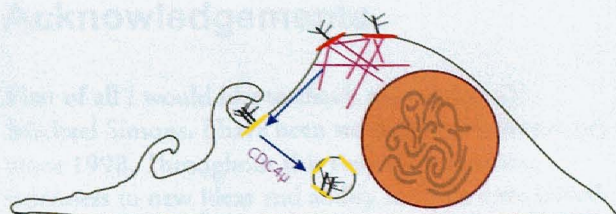
Figuur 1. Effect van 'dominant-negatieve' syndecan-4 mutaties.

Overexpressie van een gemuteerd syndecan 4 gen met een verstoorde sequentie voor de PIP₂ bindingsplaats (*links*) veroorzaakt accumulatie van syndecan 4 in het Golgi gebied en leidt tot sequestratie van de PDZ bindende eiwitten van de plasma membraan. In tegenstelling tot dit effect vormt syndecan-4 met een gemuteerd PDZ-bindings motief (*rechts*) oligomeren met endogeen eiwit waardoor het niet kan binden met de PDZ bevattende eiwitten.

dominant negatief fenotype in endotheelcellen dat gekenmerkt werd door een afname van hun proliferatie en migratie capaciteit. Verder toonden deze cellen verstoring in buis-formatie in matrigel-assays. Dit effect werd veroorzaakt door een afname in de syndecan-4 geïnduceerde activatie van PKC α .

Dus, PDZ-bindende partners van syndecan-4 spelen een belangrijke rol in de modulatie van FGF-2 signaaltransductie. Een syndecan-4 mutant met een deficiënte PIP₂- bindingsplaats werd niet tot expressie gebracht aan het oppervlak, maar accumuleerde in het golgi-gebied. We hebben daarom de hypothese opgesteld dat depletie van de PDZ-bindingspartner door competitieve binding aan het in het golgi-gebied gelegen syndecan-4, verantwoordelijk is voor het beschreven fenotype (Figuur 1). In tegenstelling tot enkelvoudige mutaties, resulteerden mutaties met verlaagde affiniteit van FGF2 voor zowel de PIP₂ bindingsplaats als het PDZ domein in een fenotype met een normale respons op FGF2 stimulatie. De rol van het PDZ bindingsmotief alsmede de identificatie van het kritische interactie-eiwit wordt verder beschreven in hoofdstuk 6.

In hoofdstuk 4 werd de membraandistributie van het syndecan-4 transmembraan en C-terminale gedeelte onderzocht door gebruik te maken van een Fc receptor (FcR)-syndecan-4 chimera vóór en na FGF-2 of antilichaam geïnduceerde clustering. De voorheen beschreven cholesterol-rijke compartimenten, lipid rafts



Figuur 2. Mechanisme van syndecan-4 geïnduceerde endocytose.

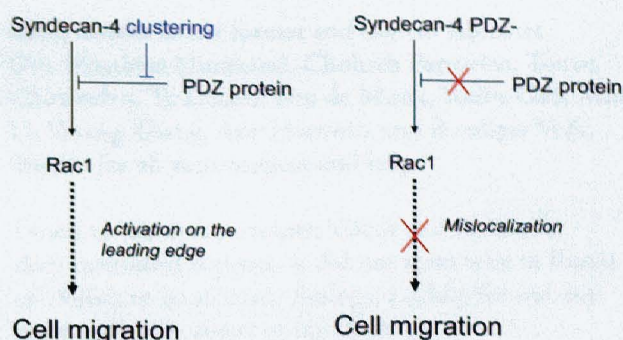
Binding van FGF2 aan syndecan-4 resulteert in een verplaatsing van het FGF2/syndecan-4 complex naar 'lipid rafts' en het complex wordt dan geïnternaliseerd via constitutieve, CDC-42 afhankelijke macropinocytose.

genoemd, bevatten een variatie aan signaaltransductiemoleculen waaronder de syndecan-4 bindingspartners Src en PKC α . Terwijl ongeclusterd syndecan-4 vooral aanwezig was in de non-raft compartimenten, zorgde clustering voor redistributie van syndecan-4 naar non-caveolae lipid rafts.

Clustering van syndecan-4 resulteerde eveneens in endocytose. Syndecan-4 positieve vesikels migreerden in tandem migreren met caveoline-vesikels. De rol van deze interactie blijft onbekend. FGF-2 geïnduceerde syndecan-4 opname speelt hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol in de modulatie van de signaaltransductie van groeifactoren.

In hoofdstuk 5 werden de initiële stappen van syndecan-4 endocytose, alsmede zijn rol in FGF2 internalisatie gekarakteriseerd. We zagen dat syndecan-4 opname na FGF2 of antilichaam geïnduceerde clustering, de integriteit van de plasmamembraan en de lipid rafts vereist voor de initiatie van de internalisatie, en dat de internalisatie onafhankelijk is van clathrin en dynamin. Onze resultaten tonen dat FGF2 endocytose afhankelijk is van clustering van syndecan-4 waarna rac1 activatie optreedt. Verder is een intacte CDC42-afhankelijke macropinocytose pathway noodzakelijk. Er zijn dus 2 stappen tijdens syndecan-4 opname. Eerst wordt syndecan-4, na clustering, verplaatst naar de lipid rafts. Vervolgens assembleert syndecan-4 een signaaltransductie-complex dat leidt tot de activatie van rac1. Vervolgens ondergaan de syndecan-4 bevattende lipid rafts endocytose en maken ze hierbij gebruik van CDC42 geïnduceerde macropinocytose (Figuur 2).

Activatie van rac1 is een kritische stap in de polarisatie en migratie van cellen. In hoofdstuk 6 hebben we de migratie van endotheelcellen na clustering van syndecan-4 onderzocht. We hebben aangetoond dat syndecan-4,



Figuur 3. Mechanisme van syndecan-4 geïnduceerde cell migratie.

Het syndecan-4 geïnduceerde signaal transductie complex is in staat om Rac1 te activeren. Interactie van syndecan-4 met PDZ-domein bevattend eiwit remt deze activatie. Clustering van syndecan-4 leidt tot activering van Rac1 door selectieve onderbreking van dit remmend effect, hetgeen leidt tot een toename van cel migratie (*links*). Mutatie van het PDZ-bindingsmotief leidt er toe dat het PDZ-domein bevattende eiwit activatie van Rac1 niet kan onderbreken en resulteert in een hoog basaal niveau van Rac1 activiteit (*rechts*).

na ligand binding, celmigratie versterkt door activatie van rac1, dat vervolgens aan de rand van de cel lokaliseert. Cellen die syndecan-4 met een gemuteerd PDZ-bindingsdomein tot expressie brengen, en cellen deficient in syntenin, een eiwit dat een PDZ-domein bevat dat een interactie aangaat met syndecan-4, migreren niet na syndecan-4 clustering (Figuur 3). Hieruit kunnen we concluderen dat syndecan-4/syntenin interacties cruciaal zijn voor syndecan-4 clustering geïnduceerde migratie.

Sammenvattend beschrijft dit proefschrift de regulatie van cellulaire en orgaanfuncties door syndecan-4. Dit varieert van de eenvoudige toename van heparan sulfaat massa tot complexe intracellulaire interacties. De beschreven 'trafficking' en signaaltransductie eigenschappen van syndecan-4 dragen bij aan het begrijpen van groeifactor en cel-matrix geïnduceerde angiogenese.